

CON. US 2002/0173523 A1

世界知的所有権機関  
国際事務局

PCT

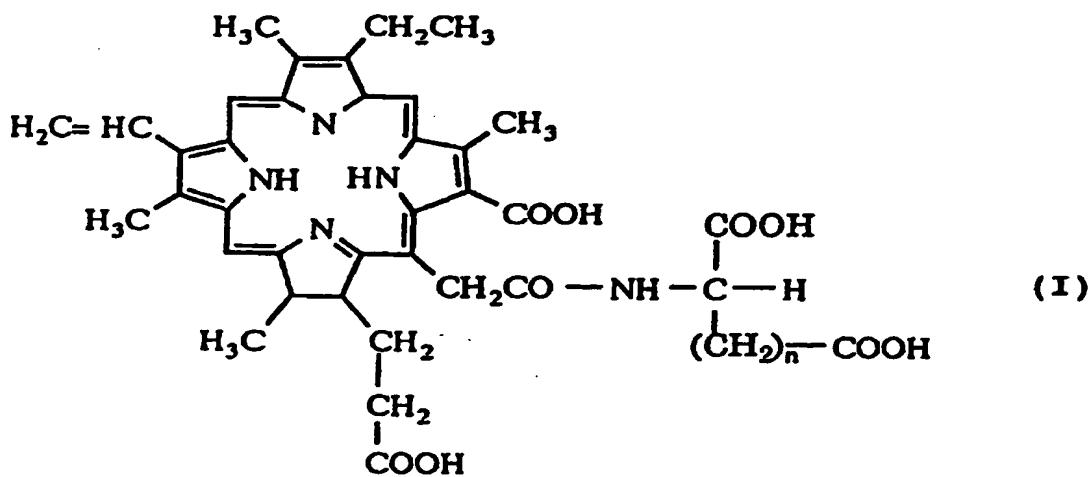
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 A61K 31/40, A61N 5/06 // C07D 487/22		A1	(11) 国際公開番号 WO99/07364
			(43) 国際公開日 1999年2月18日(18.02.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/03492			(74) 代理人 弁理士 八木田茂, 外(YAGITA, Shigeru et al.) 〒105-0003 東京都港区西新橋1丁目1番15号 物産ビル別館 Tokyo, (JP)
(22) 国際出願日 1998年8月5日(05.08.98)			(81) 指定国 AU, CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(30) 優先権データ 特願平9/210395 1997年8月5日(05.08.97) JP			添付公開書類 国際調査報告書
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 明治製菓株式会社(MEIJI SEIKA KAISHA LTD.)(JP/JP) 〒104-0031 東京都中央区京橋2丁目4番16号 Tokyo, (JP)			
(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 黒岩ゆかり(KUROIWA, Yukari)(JP/JP) 荒明美奈子(ARAAKE, Minako)(JP/JP) 〒222-0002 神奈川県横浜市港北区師岡町760番地 明治製菓株式会社 薬品総合研究所内 Kanagawa, (JP) 會沢勝夫(AIZAWA, Katsuo)(JP/JP) 〒160-0022 東京都新宿区新宿6丁目1番1号 東京医科大学内 Tokyo, (JP)			

(54) Title: IMMUNOSUPPRESSION BY PHOTOCHEMOTHERAPY

(54) 発明の名称 光化学療法による免疫の抑制

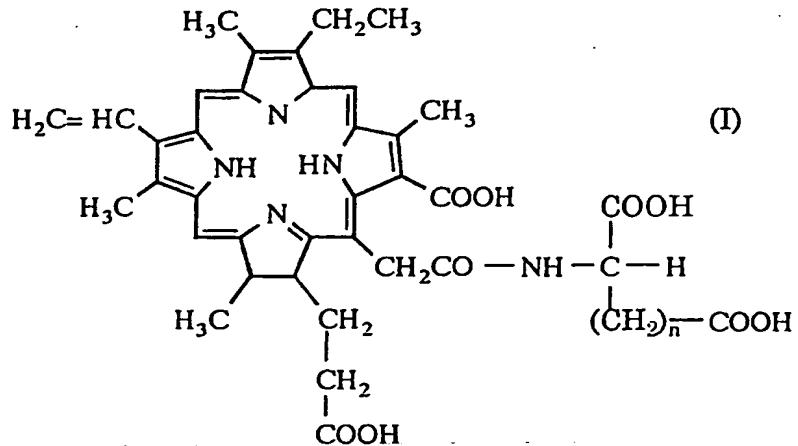


## (57) Abstract

Immunosuppressive compositions for phototherapy which contain as the active ingredient tetracycline derivatives represented by general formula (I) or pharmacologically acceptable salts thereof wherein n is 1 or 2. Administration of the derivatives of general formula (I) or salts thereof as immunosuppressive agents in phototherapy makes it possible to prevent or treat abnormally supernumerary immune responses, for example, contact hypersensitivity or implant rejection reactions.

(57)要約

下記の一般式(I)のテトラビロール誘導体またはその  
薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する光化  
学療法用の免疫抑制剤組成物が提供される。



但し  $n$  は 1 または 2 である。一般式(I)の誘導体またはその塩を光化学療法で免疫抑制剤として投与することにより、異常に過剰に起る免疫応答、例えば接触性過敏症あるいは移植片への拒絶反応を予防または治療することが可能である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルベニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	S I	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	S K	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	S L	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英國	LT	リトアニア	S N	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	S Z	スウェーデン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	T D	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	T J	タジキスタン
BE	ベルギー	GM	カンピア	MD	モルドヴァ	T M	トルクメニスタン
BF	ブルガリア	GN	ギニア	MG	マダガスカル	T R	トルコ
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサオ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	T T	トリニダード・トバゴ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	ML	マリ	U A	ウクライナ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	MN	モンゴル	U G	ウガンダ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	U S	米国
CA	カナダ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	U Z	ウズベキスタン
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	V N	ヴィエトナム
CG	コンゴー	IL	イスラエル	NE	ニジエール	Y U	ユーロースラビア
CH	スイス	IN	インド	NL	オランダ	Z W	ジンバブエ
CI	コートジボアール	IS	アイスランド	NO	ノールウェー		
CM	カメルーン	IT	イタリア	NZ	ニュージーランド		
CN	中国	JP	日本	P L	ポーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	P T	ポルトガル		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	RO	ルーマニア		
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	RU	ロシア		
DE	ドイツ	KR	韓国	SD	スードン		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SE	スウェーデン		
EE	エストニア	LC	セントルシア	SG	シンガポール		
ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン				

## 明細書

## 光化学療法による免疫の抑制

## 技術分野

本発明は、光化学療法に使用する新規な免疫抑制剤組成物に関する。本発明による免疫抑制剤組成物は、蛍光性テトラビロール誘導体またはその塩を有効成分として含有するものである。また、本発明は、蛍光性テトラビロール誘導体またはその塩を免疫抑制剤として投与し、次いでレーザー光で該誘導体を照射することから成る、過剰な免疫応答を抑制するための光化学療法的な新規な方法にも関する。

## 背景技術

光化学療法とは、紫外線またはレーザー光の照射により励起される光感受性物質の投与により病気の治療を行なう化学療法である。この方法においては、前投与された光感受性物質が集積して存在する生体の組織部位、または光感受性物質を含む体内血液あるいは該血液を体外循環させた血流に光の照射を施すなどにより、光感受性物質を励起して治療作用を発揮させるものである。

例えば特公平 6-88902 号公報および特公平 6-89000 号公報ならびにこれらに対応の米国特許第 4,675,338 号明細書および米国特許第 4,693,885 号明細書には、カルボキシル基およびカルボン酸側鎖を複数個有する或る種のテトラビロール化合物の少なくとも 1 個のカルボキシル

基に対して、炭素数 4~10 のアミノジカルボン酸、例えばアスパラギン酸またはグルタミン酸をこれのアミノ基の所で 1 個またはそれ以上のアミド結合により縮合させてなる蛍光性のテトラビロール誘導体、例えばモノ-L-5 アスパルチルクロリン e6 およびモノ-L-グルタミルクロリン e6 あるいはそれらの塩が記載され、また該テトラビロール誘導体を光化学療法剤として腫瘍の診断および治療に用いることが記載される。また上記の特許明細書には、投与後に腫瘍組織内に集積した前記の蛍光性テト10 ラビロール誘導体が強力な光の照射、例えばレーザービームの照射を受けると励起されて腫瘍細胞に死滅作用を及ぼすことが記載されている。

光化学療法は上記のような癌治療のほかに、眼の脈絡膜などの新生血管の閉塞法に利用が可能であることも発15 表されている(特開平 9-71531 号公報および米国特許第 5,633,275 号明細書参照)。

また米国特許第 5,028,594 号には、光化学療法を、リウマチ様関節炎に関与する造血細胞を選択的に除去する方法に応用することが発表されている。他方、ケニース20 らは、増殖性関節疾患に対し光化学療法を応用して、滑膜細胞の破壊を起こすことから成る、増殖性関節疾患の治療法を発表している(PCT 出願国際公開 WO94/17797 号明細書)。

また、生体内では、非自己の異物質の侵入に対して免

免疫応答が起こり、これによって生体の恒常性が維持されている。しかし、ある場合には、このような免疫応答が異常に過剰に起こり、生体に害を及ぼしてしまう場合がある。例えば、有害に起る免疫応答は自己免疫疾患であつたり、あるいは臓器移植における拒絶反応である。このような場合、生体内で異常に起こっている過剰な免疫応答を調節する治療法が望まれる。このような目的のために開発された薬剤が広義の免疫調節剤である。広義の免疫調節剤は大きく3つに分けられる。

すなわち、免疫賦活剤と狭義の免疫調節剤と免疫抑制剤である。免疫賦活剤は、免疫応答を増強するような薬剤であり、悪性腫瘍や感染症などの治療に用いられる。狭義の免疫調節剤は生体内で起る免疫応答の異常を是正しようとするものであり、自己免疫疾患や各種アレルギーの治療に用いられる。免疫抑制剤とは、過剰の免疫応答を抑制するものであり、自己免疫疾患、悪性腫瘍、臓器移植における移植片拒絶反応などの疾患に使用する(宮坂信之「治療学」26巻、2号、15~18頁、参照)。

また、アレルギーは Coombs と Gell の分類によると I 型~IV 型に分類される。IV 型のアレルギーには接触性過敏症、ツベルクリン型過敏症、肉芽腫形成性過敏症などがある。

IV 型アレルギーに属する過敏症は体液性免疫反応ではなく、細胞性免疫反応である(免疫学イラストレイテッ

ド、著者: Ivan Roitt Jonathan Brostoff David Male、  
原書第3版、多田富雄監訳、南江堂、325~336頁)。接  
触性過敏症はアレルゲンが付着した皮膚に出現するかゆ  
みを伴う湿疹反応である。この湿疹反応では、分子量が  
5 1000以下の化学物質がアレルゲンとなり、アレルゲンが、  
表皮細胞の細胞膜タンパク質と結合物を形成し、ランゲ  
ルハンス細胞を介してT細胞にアレルゲンの情報が伝達  
され、T細胞の働きによって、接触性過敏症が惹起され  
る。接触性過敏症の代表的なアレルギー性接触皮膚炎の  
10 治療には、糖質コルチコイド剤や副腎皮質刺激ホルモン  
(ACTH)などが非特異的な免疫抑制剤として用いられて  
いる。

他方、近年では、腎臓移植をはじめ様々な臓器移植が  
盛んに行われるようになっている。このような臓器移植  
15においては、拒絶反応が起こる。この拒絶反応を抑制す  
るために、放射線照射が行われたり、あるいはシクロス  
ボリンやFK506などの免疫抑制剤が投与されている。し  
かし、これら免疫抑制の手段は、易感染による重篤な日  
和見感染症を起こしたり、骨髓抑制などの副作用を起こ  
20 すことが知られている(本間光夫「治療学」26巻、2号、  
10~13頁)。

上記のように、腫瘍細胞の破壊や、造血細胞の除去や、  
また関節リウマチなどの増殖性滑膜細胞の破壊や、新  
生血管の閉塞のための光化学療法の応用については報告

がなされているが、光化学療法を免疫の抑制の目的で応用することについての発表はいまだなされていない。

本発明の目的は、接触性過敏症の予防または治療や、臓器移植の際の拒絶反応の予防または治療に適する光化学療法を開発することであり、また光化学療法を免疫抑制の手段として応用するのに使用するのに適する新規な免疫抑制剤を提供することである。

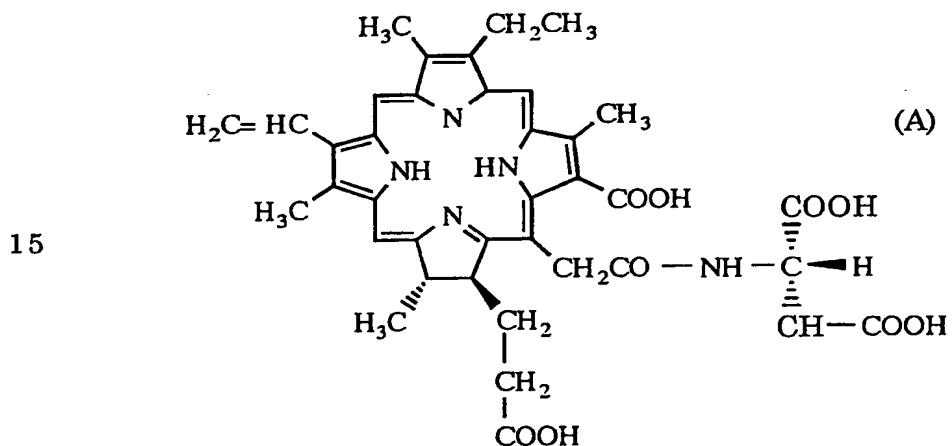
さらに、本発明の別の目的は、後記の説明から明らかになるであろう。

#### 10 発明の開示

本発明者らは、前記の目的で接触性過敏症の予防または治療や、臓器移植時の拒絶反応の予防または治療のために応用できる光化学療法を新しく開発する研究を行い、また光励起できて免疫抑制作用を発揮できる薬剤を探索する研究を行った。その結果、前記の特公平 6-88902 号公報、特公平 6-89000 号公報、米国特許第 4,675,338 号明細書ならびに米国特許第 4,693,885 号明細書に記載されてあって悪性腫瘍の光化学療法として試験中である光感受性物質であるモノ-L-アスパルチルクロリン e6(Mono-L-aspartyl Chlorin e6)四ナトリウム塩を接触性過敏症を起しうるマウスに静脈内投与後、皮膚下の血管中の循環血に 664nm のレーザー光を照射する光化学療法を実施することにより、前記の供試化合物が接触性過敏症のテストで見られるマウスの耳朵の腫れを著しく

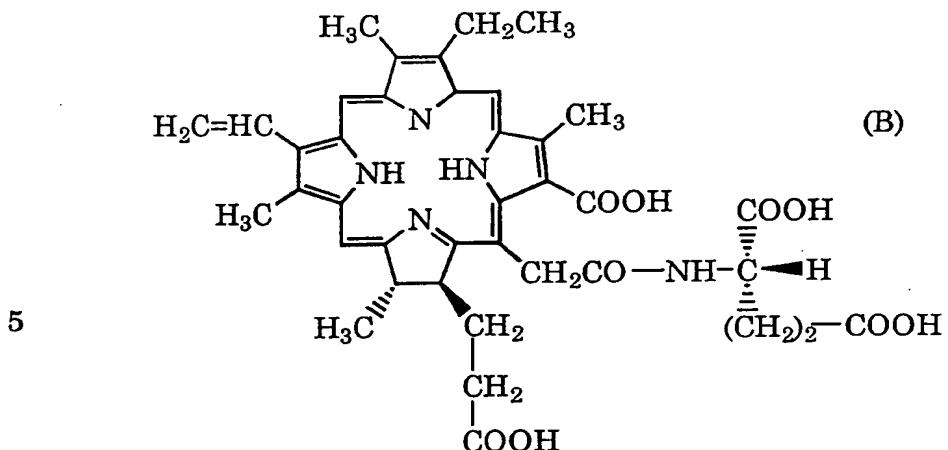
抑制させる免疫抑制作用を有すること、及び、同様な光化学療法を受けたマウスにおいては、遺伝形質の異なるマウス間の皮膚移植における拒絶反応を予防的に抑制する免疫抑制作用を有することが知見された。また、モノ  
5 -L-グルタミルクロリン e6 四ナトリウム塩も同様な免疫抑制作用を有することが期待できる。

モノ-L-アスパルチルクロリン e6 とモノ-L-グルタミルクロリン e6 とは、それぞれに、米国特許第 4,675,338 号明細書の実施例 19 と実施例 21 にそれぞれ記載された  
10 製法で製造できた化合物である。モノ-L-アスパルチルクロリン e6 は次式(A)



で表される化学構造を有する物質であると最近の研究に  
20 よって認められた。

また、モノ-L-グルタミルクロリン e6 は次式(B)

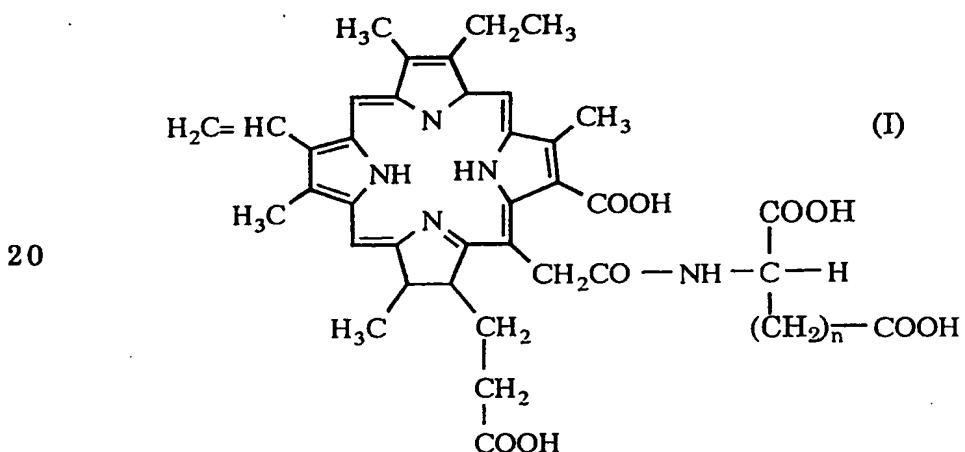


で表される化学構造を有する物質であると認められて  
いる。

10 さらに、一般的に、後記の一般式(I)で表される蛍光性  
テトラビロール誘導体またはこれの薬理学的に許容され  
る塩は、光化学療法で用いられる場合に、免疫抑制作用  
を有するものであることが知見された。これらの知見に  
基づいて、本発明を完成させた。

15 したがって、第1の本発明においては、下記の一般式

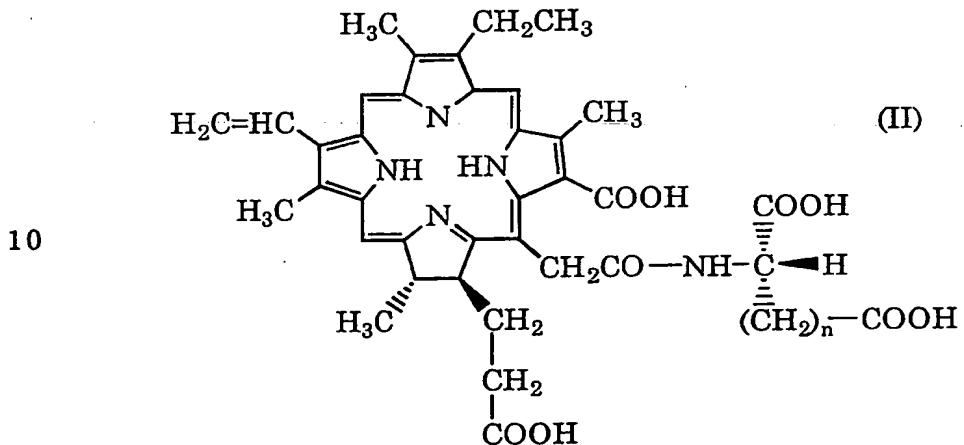
(I)



(式中、nは1または2の整数を示す)で表される蛍光性

テトラピロール誘導体、もしくは薬理学的に許容されるその塩を有効成分として含有し、しかも有効成分と混和された製薬学的に許容できる担体を含有することを特徴とする、光化学療法用の免疫抑制剤組成物が提供される。

5 本発明の免疫抑制剤組成物に用いられる一般式(I)のテトラピロール誘導体は、下記の一般式(II)



(式中、nは1または2の整数を示す)で表わされる立体15配置を有するテトラピロール誘導体であることが好ましい。

上記の一般式(II)で表される化合物のうち、n=1の化合物は、上記の式に示されるテトラピロール環の側鎖部分であるアセチル基-CH<sub>2</sub>COOHにL-アスパラギン酸が20そのアミノ基でアミド結合している形の化合物である。この化合物がモノ-L-アスパルチルクロリン e6である。この化合物の4個のカルボキシル基において、四ナトリウム塩の形であるのが好ましい。

上記の一般式(II)で表される化合物のうち、n=2の化

合物は、上記の L-アスパラギン酸の代わりに L-グルタミン酸がアミド結合している形の化合物である。これがモノ-L-グルタミルクロリン e6 である。

本発明で用いる一般式(I)または(II)の化合物は、分子  
5 中に 4 個のカルボキシル基を含み、一般的には、塩基と結合して薬理学的に許容できる塩を形成してもよい。塩基と反応して形成される塩としては、例えばナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、アンモニウム、との塩、あるいはトリエチルアミン、トリメチルアミン、  
10 モルホリンおよびピペリジンとの付加塩がある。

第 1 の本発明による免疫抑制剤組成物は、異常に過剰に起る免疫応答に関わる疾患、例えば接触性過敏症、ツベルクリン型過敏症、肉芽腫形成性過敏症の予防または治療に有効であり、また臓器あるいは皮膚の移植後の拒絶反応の予防または軽減に有効である。  
15

第 1 の本発明の組成物で有効成分として含有される一般式(I)または一般式(II)の化合物またはその塩は、経口的に投与でき、あるいは静脈内または筋肉内注射によりあるいは直腸内投与により非経口的に投与することができる。また上記の化合物は経皮的にも投与できる。例えば、本発明の組成物は一般式(I)の化合物、好ましくは一般式(II)の化合物を四ナトリウム塩の形で含み、しかも凍結乾燥した無菌のかつ発熱物質を含まない組成物として製剤することができる。

経口投与用の本発明組成物では、有効成分としての一般式(I)の化合物またはその塩を固体または液体状の担体と混和して含有することができ、そして錠剤、口腔剤、トローチ剤、カプセル剤、懸濁剤、シロップ剤等の形で  
5 製剤とすることができます。

第1の本発明の組成物における有効成分としての一般式(I)または一般式(II)の化合物またはその塩の含量割合は剤形によって異なる。前記の化合物の好都合な含量割合は投与単位物の重量の約 2~60%の範囲にあるのがよ  
10 い。

第1の本発明の組成物の注射用の望ましい製剤としては、有効成分の一般式(I)の化合物を含む無菌の水溶液または分散液あるいは無菌の凍結乾燥剤がある。ここに用いる液体担体としては例えば水、エタノール、グリセロール、プロピレングリコール、植物油などが好ましい。  
15 また多くの場合、注射用製剤は、等張剤、例えば糖または塩化ナトリウムを含むことが好ましい。

第1の本発明の組成物を注射用製剤とする場合には、有効成分としての一般式(I)の化合物の吸収を遅らせる  
20 薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムあるいはゼラチンを配合させることができる。

第1の本発明の免疫抑制剤組成物に含まれる一般式(I)の化合物またはその塩の投与量は、治療の目的および症状の程度などによって異なるが、一般的には成人に対し

1日当たり該化合物の0.2~10mgを一回投与する。最適な投与量は、専門家による適當な予備試験に基づいて適當に決定できる。

第1の本発明による医薬組成物を投与した後に、血流中に存在する式(I)の化合物またはその塩を、620~760nmの波長のレーザー光の照射により光化学的に励起させる。ここに用いられるレーザー光の照射源としては、光フィルターを有する強力なレーザー連続光源、励起した色素、または他のレーザー送光システムを利用できる。上記レーザー光の照射源は、620~760nmの波長で、10~100mM/cm<sup>2</sup>の照射強度で、少なくとも500mWの全出力でレーザーを発振できるレーザー光源であることが望まれる。現在、市販されているいくつかのレーザー発振器は前記のレーザー発振基準を満足するものである。

前記の一般式(I)で表される化合物の一例であるモノ-L-アスパルチルクロリン e6 四ナトリウム塩を雄のマウス CD-1に対する急性毒性について試験したところ、それのLD<sub>50</sub>は164mg/kgであった。またモノ-L-アスパルチルクロリン e6 四ナトリウム塩は光毒性試験において、紅斑、浮腫等の反応を全く示さず、安全性の高い化合物であることが認められた。

第2の本発明においては、異常に過剰に起る免疫反応を受け易い人間または哺乳動物に、前記の一般式(I)の虫

光性テトラビロール誘導体またはこれの薬理学的に許容できる塩、好ましくはモノ-L-アスパルチルクロリン e6 またはモノ-L-グルタミンクロリン e6 またはその薬理学的に許容できる塩の治療的有効量を経口的にまたは非経口的に投与し、さらに投与された前記の化合物を含有する血管内の血流をレーザー光で照射し、これによって、血流に含有された一般式(I)のテトラビロール誘導体またはその塩を、照射したレーザー光に露光させて光化学的に励起させて活性酸素を発生させ、そしてその活性酸素によって免疫の発現を低減または抑制させることから成る、異常に過剰に起る免疫応答を予防または治療するための光化学療法的方法が提供される。

第 2 の本発明による治療方法においては、一般式(I)のテトラビロール誘導体、好ましくはモノ-L-アスパルチルクロリン e6 またはモノ-L-グルタミンクロリン e6 またはその塩は、非経口的に投与される場合、静脈内または筋肉内注射によってまたは経直腸的にも投与できる。あるいは、経口的に投与できる。その投与量は、その投与後にレーザー光の照射を受けた時に、血流中で光化学的に励起された前記テトラビロール誘導体、特にモノ-L-アスパルチルクロリン e6 またはモノ-L-グルタミンクロリン e6 またはその塩が活性酸素を発生させ得るのに足る有効量である。

照射すべきレーザー光は、ビーム光として、患者の全

身あるいは種々な部位、例えば腹部、脚部、手部の皮膚の上から照射されてよく、これによって、レーザー光が皮膚下の血管血流に達し得るように皮膚層および血管壁層を透過できるようにして照射を行うことができる。また、体外循環された血流に対して照射を行ってもよい。

レーザー光の照射の回数は1回またはそれ以上の回数であることができる。投与された化合物の投与量と、レーザー光の照射の回数との組合せは、免疫を抑制して所期の治療効果を与えるのに十分な程度であればよい。一般式(I)の化合物の投与量と、レーザー光照射の必要な回数は、治療の目的に応じて、専門家による予備試験で容易に決定できる。照射されるレーザー光は、620～760nmの波長の光であるのが好ましく、10～100mW/cm<sup>2</sup>の照射強度で照射されることができる。

第2の本発明による光化学療法的治療方法は、接触性過敏症の予防または治療に有効である。また、第2の本発明の方法は移植片への拒絶反応の予防または治療にも有効である。

さらに、本発明のさらに別の要旨においては、異常に過剰に起る免疫応答を光化学療法的に予防または治療するのに用いる免疫抑制剤組成物を製造するための、前記の一般式(I)のテトラピロール誘導体またはその薬理学的に許容できる塩の使用が提供される。

発明を実施するための最良の形態

本発明を以下の試験例及び実施例により詳細に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

#### 試験例 1

(i) モノ-L-アスパルチルクロリン e6 四ナトリウム塩 5 を 20mg/ml の濃度で生理食塩水に溶解し、その溶液を無菌処理して注射液を調製した。供試化合物としてモノ-L-アスパルチルクロリン e6 四ナトリウム塩の投与量が 0.001mg/kg、0.05mg/kg、0.01mg/kg または 0.1mg/kg になるように種々の液量で前記の注射液を 10 週令の 10 BALB/c マウス(1 群 5 匹)に静脈注射した。その静脈注射の後にマウス腹側を剃毛した。供試化合物の投与後 30 分間してから波長 664nm のレーザー光を出力 20mW/cm<sup>2</sup>、照射の直径 18mm で、総照射量 10J/cm<sup>2</sup>となるようにマウスの腹部皮膚上に照射した。これによつ 15 て、マウス腹部の皮膚下にある血管に存在するモノ-L-アスパルチルクロリン e6 四ナトリウム塩はレーザー光を受けて、その結果、光化学的に励起された。

(ii) モノ-L-アスパルチルクロリン e6 四ナトリウム塩の投与から 24 時間後に、前記のレーザー光照射を受け 20 た前記のマウス(1 群、5 匹)の頸部、両腋窩および両鼠蹊部に、感作物質である塩化ピクリルを 5%(w/v)で含む水溶液を経表皮塗布して感作した(一次感作)。

一次感作から 5 日後、1%の塩化ピクリルを含む水溶液を片方の耳朶に塗布して二次感作を行った。このように

して、接触性過敏症マウスの処理群を作成した。

(iii) その二次感作から 24 時間後に、すなわち一次感作から 6 日後に、マウスの両方の耳朶の厚さをシックネスゲージ(thickness gauge) で測定し、塩化ピクリルを塗布されなかつた方の耳朶の厚さと、塩化ピクリル塗布による二次感作を受けた方の耳朶の厚さとの差から、耳朶の厚さの増大を算出した。上記の供試化合物の投与もレーザー光照射も受けなかつたが塩化ピクリルによる一次および二次感作のみを受けたマウスよりなる非処理群のマウスにおける二次感作を受けた方の耳朶の厚さの増大の平均値を 100%とみなした基準にて、各々の処理マウスの耳介腫脹度を算定した。

算定された耳介腫脹度 (%)を次の表 1 に示す。

表 1

供試化合物の投与量(mg/kg)	耳介腫脹度 (%) (平均値±標準偏差)
0 (非処理群)	100
0.001 (処理群)	54.4±7.2
0.01 (処理群)	53.2±20.6
0.05 (処理群)	33.3±4.4
0.1 (処理群)	27.8±8.5

表 1 に示された結果から明らかなように、モノ-L-アスパルチルクロリン e6 四ナトリウム塩を 0.001mg/kg またはそれ以上の投与量で静脈内投与し、次いでレーザー光の照射を施すことにより行われた光化学療法は、塩化ピクリルで一次感作および二次感作をされたマウスの耳介

腫脹度を 45% 以上の割合で抑制できたことが認められた。マウスをアレルゲンとしての塩化ピクリルで一次感作および二次感作することにより行われる上記の耳介腫脹度の測定試験は接触性過敏症の典型的な実験である。従つて、モノ-L-アスバルチルクロリン e6 四ナトリウム塩を静脈内投与し、次いでレーザー光を照射することによって行われた前記の光化学療法の試験によって、耳介腫脹度が有意に抑制できたことは、異常に過剰に起る免疫応答を有意に抑制できたことを示すものである。

#### 10 試験例 2

マウスの皮膚移植への拒絶反応に対する本発明の光化学療法の治療効果をみるために、下記の実験を行った。すなわち、皮膚移植を受けるマウス（レシピエント）としては BALB/c (H-2K<sup>d</sup>) マウス（1群 10 匹）を用いた。先ず、このレシピエントマウスには、皮膚の移植前日に供試化合物としてモノ-L-アスバルチルクロリン e6 四ナトリウム塩を 1mg/kg の用量で静脈内投与し、その後に、マウス腹部を剃毛した。その静脈内投与後 30 分間してから、レシピエントマウスの腹部に波長 664nm のレーザー光を出力 20mW/cm<sup>2</sup>、照射直径 18mm で、総照射量 10J/cm<sup>2</sup> となるように照射した。

他方、移植用の皮膚の提供マウス（ドナー）としては CH/HeN(H-2K<sup>b</sup>) マウスを用いた。移植する皮膚はドナーマウスの尾部の皮膚約 5mm × 5mm をカットしたものを

用い、この皮膚切片を、背部皮膚を剃毛および剥離されたレシピエントマウスの背部の皮膚剥離部に移植した。

なお、この皮膚の移植手術は、レシピエントマウスがレーザー光照射を受けた時から 24 時間経過後に行われた。

5 その皮膚の移植後から、供試化合物の静脈内投与後 15 日に至るまでの期間において、レシピエントマウスからの移植皮膚片の脱落の有無を観察した。

夫々の観察日における正常に移植皮膚片が残存しているマウスの数を、移植当日の皮膚片の移植を受けたマウスの数を 100 とみなした場合に対する百分率(%)として、算出した。

なお、非処理群のマウスは、供試化合物の投与も、レーザー光の照射も受けないで、皮膚片の移植のみを受けた。

15 その結果を次の表 2 に示す。

表 2

経過日数(day)	移植皮膚片の残存したマウスの百分率(%)	
	対照群(非処理群)	供試化合物投与群
0(移植当日)	100	100
6	50	100
7	50	80
10	0	80
11	0	80
15	0	0

20

移植された皮膚片の脱落は、免疫的拒絶反応がレシピエントマウスで過剰に起きたことに基づくものである。

表 2 の結果から明らかなように、モノ-L-アスパルチルクロリン e6 四ナトリウム塩の投与とレーザー光の照射とからなる光化学療法的治療法を受けたレシピエントマウス(治療群)では、皮膚片の移植日から、その 6 日目～11 5 日目にわたる期間において皮膚片の脱落が供試マウスのうちの 20%で起きたのみであった。これに対して、同じ期間中に対照群(非処理群)のマウスの全例で移植皮膚片がすべて脱落したことが認められる。従って、本例で行われた光化学療法は、皮膚片の移植時に起る拒絶反応を 10 有意に抑制していることが判る。

次に、本発明による免疫抑制剤組成物の製剤の組成例を実施例で示す。

#### 実施例 1

下記の成分を下記の重量割合で混合し、基剤用粉末を 15 製造した。

蔗 糖	80.3g
タビオカデンプン	13.2g
ステアリン酸マグネシウム	4.4g

この基剤用粉末に、適当な量でモノ-L-アスパルチルクロリン e6 四ナトリウム塩を配合し、常法で打錠して、 20 それぞれ錠剤 1 個当たりに 100mg のモノ-L-アスパルチルクロリン e6 四ナトリウム塩を活性成分として含む錠剤を製造した。

#### 実施例 2

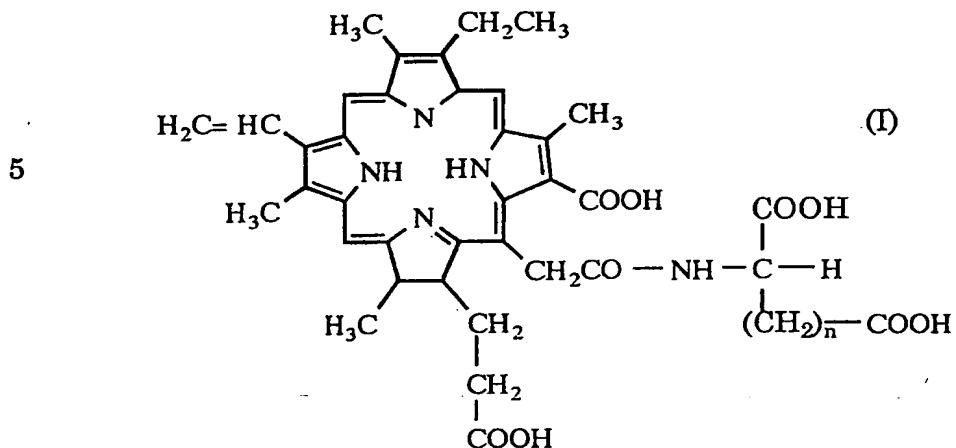
200mg のモノ-L-アスパルチルクロリン e6 四ナトリウム塩を、これの最終濃度が 20mg/ml になるように生理食塩水中に溶解した。この溶液を無菌処理して注射用溶液を得た。この溶液は静脈内投与および筋肉内投与に適す  
5 るものであった。

#### 産業上の利用可能性

前記に説明したとおり、本発明によると、異常に過剰に免疫応答を起し易い人間または哺乳動物に、前記一般式 (I) のテトラビロール誘導体、好ましくはモノ-L-アスパルチルまたはモノ-L-グルタミルクロリン e6 またはその塩を投与し、そしてその後に該化合物を含有する血液流をレーザー光で照射する光化学療法的な手法によつて、過剰な免疫応答に基因して起る各種の免疫的な疾患を光化学療法により予防または治療するのに有効であり、  
10  
15 しかも安全性が高い。

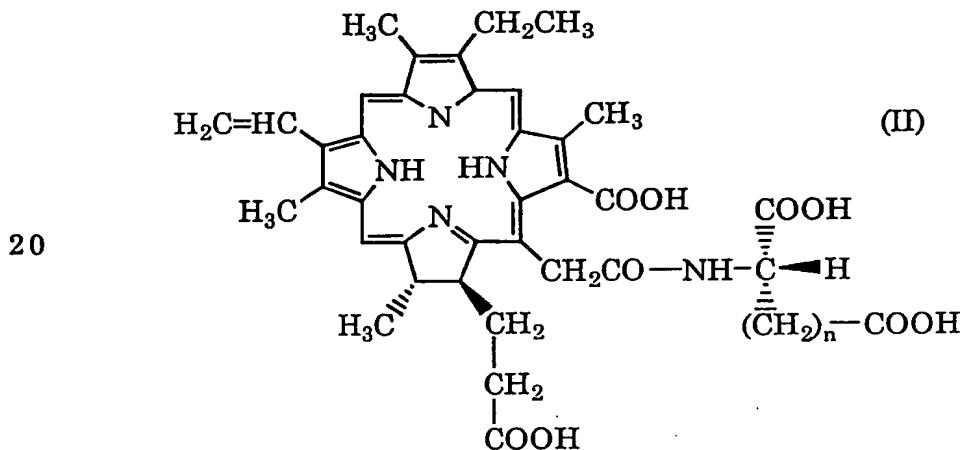
## 請求の範囲

## 1. 次の一般式(I)



10 (式中、n は 1 または 2 の整数を示す)で表される蛍光性  
テトラピロール誘導体、もしくは薬理学的に許容される  
その塩を有効成分として含有し、しかも有効成分と混和  
された製薬学的に許容できる担体を含有することを特徴  
とする、光化学療法用の免疫抑制剤組成物。

15 2. 請求の範囲 1 に示される一般式(I)のテトラピロー  
ル誘導体が次の一般式(II)



(式中、n は 1 または 2 の整数を示す)で表される立体異

性体である請求の範囲 1 に記載の組成物。

3. 一般式(I)または一般式(II)の化合物またはその塩がモノ-L-アスパルチルクロリン e6 またはこれの四ナトリウム塩である請求の範囲 1 または 2 に記載の組成物。

5 4. 免疫抑制が接触性過敏症の予防または治療に適用されるところの請求の範囲 1 に記載の組成物。

5. 免疫抑制が移植片の拒絶反応の予防または治療に適用されるところの請求の範囲 1 に記載の組成物。

6. 異常に過剰に起る免疫反応を受け易い人間または  
10 哺乳動物に、請求の範囲 1 に示された一般式(I)の蛍光性  
テトラビロール誘導体またはこれの薬理学的に許容でき  
る塩、好ましくはモノ-L-アスパルチルクロリン e6 また  
はモノ-L-グルタミンクロリン e6 またはその薬理学的に  
許容できる塩の治療的有効量を経口的にまたは非経口的  
に投与し、さらに投与された前記の化合物を含有する血  
管内の血流をレーザー光で照射し、これによって、血流  
に含有された一般式(I)のテトラビロール誘導体または  
その塩を、照射したレーザー光に露光させて光化学的に  
励起させて活性酸素を発生させ、そしてその活性酸素に  
15 より免疫の発現を低減または抑制させることから成る、  
異常に過剰に起る免疫応答を予防または治療するための  
光化学療法的方法。

7. 投与されるテトラビロール誘導体がモノ-L-アス  
パルチルクロリン e6 またはこれの四ナトリウム塩であ

る請求の範囲 6 に記載の方法。

8. 投与されるテトラビロール誘導体がモノ-L-グルタミルクロリン e6 またはこれの四ナトリウム塩である請求の範囲 6 に記載の方法。

5 9. 照射されるレーザー光が 620~760nm の波長のレーザー光である請求の範囲 6 に記載の方法。

10. 予防または治療される免疫応答が接触性過敏症である請求の範囲 6 に記載の方法。

11. 予防または治療される免疫応答が移植片への拒絶  
10 反応である請求の範囲 6 に記載の方法。

12. 異常に過剰に起る免疫応答を光化学療法的に予防または治療するのに用いる免疫抑制剤組成物を製造するための、請求の範囲 1 に示される一般式(I)のテトラビロール誘導体またはその薬理学的に許容できる塩の使用。

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP98/03492

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
Int.Cl<sup>6</sup> A61K31/40, A61N5/06 // C07D487/22

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> A61K31/40, A61N5/06 // C07D487/22

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CA (STN), REGISTRY (SYN)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US, 4675338, A (Nippon Petrochemicals Co. Ltd.), 23 July, 1987 (23. 07. 87) & JP, 61-83186, A & JP, 61-129163, A & EP, 168832, A	1-5
Y	van IPEREN, H. Peter et al., Non-specific systemic immune suppression induced by photodynamic treatment of lymph node cells with bacteriochlorin a., Journal of Photochemistry and Photobiology B, 1995, Vol. 28, pp.197-202	1-5

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
20 October, 1998 (20. 10. 98)

Date of mailing of the international search report  
4 November, 1998 (04. 11. 98)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP98/03492

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 6-12

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 6 to 12 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2.  Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3.  Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest  The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. A61K31/40, A61N5/06//C07D487/22

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. A61K31/40, A61N5/06//C07D487/22

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN)、REGISTRY (SYN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	US, 4675338, A (Nippon Petrochemicals Co. Ltd.) 23. 7月. 1987 (23. 07. 87) & JP, 61-83186, A&JP, 61-129163, A& EP, 168832, A	1-5
Y	van IPEREN, H. Peter et al, Non-specific systemic immune suppression induced by photodynamic treatment of lymph node cells with bacteriochlorin $\alpha$ , Journal of Photochemistry and Photobiology B, 1995, Vol. 28, pp. 197-202	1-5

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20. 10. 98

国際調査報告の発送日

04.11.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

浦原下告印

4C 9284

電話番号 03-3581-1101 内線 3453

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの1の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 6-12 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲6-12は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。

2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの2の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあつた。  
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかつた。